

STIC-ILL

342, 242

Fr m: Huynh, Phuong N.  
Sent: Thursday, April 19, 2001 9:15 AM  
T : STIC-ILL  
Subject: RE: 09/684,794

Please deliver the following:

Science, (Oct., 1999) Vol. 41, No. 5, pp. 563-574.

ANTI- \*\*\*STREPTOCOCCUS\*\*\* - \*\*\*MUTANS\*\*\* \*\*\*IGY\*\*\* . TAGUCHI T;  
HIRASAWA M; ASAKA H; HONDA M; NIIHO K; OTAKE S. NIHON UNIV. SCH. DENT.  
MATSUDO, JPN.. JOINT MEETING OF THE 70TH GENERAL MEETING OF THE  
INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR DENTAL RESEARCH (IADR), 40TH ANNUAL MEETING  
OF THE BRITISH DIVISION OF THE IADR, 1992 ANNUAL MEETING OF THE  
CONTINENTAL EUROPEAN DIVISION OF THE IADR, 8TH ANNUAL MEETING OF THE IRISH  
DIVISION OF THE IADR, AND THE 75TH ANNUAL MEETING OF THE SCANDINAVIAN  
ASSOCIATION FOR DENTAL RESEARCH, GLASGOW, SCOTLAND, UK, JULY 1-4, 1992.  
J DENT RES. (1992) 71 (SPEC ISSUE), 650. CODEN: JDREAF. ISSN: 0022-0345.  
Language: English.

Nippon Nogeikagaku Kaishi, (1993) Vol. 67, No. 10, pp. 1437-1439. ISSN:  
0002-1407. Language: Japanese.

MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, (1978) 22 (6): 301-14.

Thanks,  
Neon  
Art unit 1644  
Mail CM1, 9E12

No 4/19

Cai 4-19

# \*\*\*ミニレビュー\*\*\* [Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol.67, No.10, pp.1437~1439, 1993]

## 鶏卵抗体の口腔疾患および消化管感染予防への利用†

大竹繁雄, 平澤正知, 津田 憲\*

(日本大学松戸歯学部, \*太陽化学株式会社)

食品である鶏卵から特異的抗体が得られるようになったことから, 近年, 鶏卵抗体を利用した受動免疫の研究が注目されている. 従来の抗体を利用した受動免疫の応用例としては, 重症感染症あるいは無ガンマグロブリン血症の患者に対するヒト免疫グロブリンの投与がある. すなわちヒト血清から IgG 画分を精製したものを静注することにより広い抗体スペクトルと高いオプソニン効果を期待するものである. またボツリヌス菌のような重症の食中毒の場合や霉へびに噛まれたときなどに特異的抗体を含む抗毒素血清を投与し, 治療を行うこともある. その他 B 型肝炎キャリアの母親から生まれた赤ちゃんは出生直後からウイルスに対する抗体を含む免疫グロブリンを投与し, キャリア化になるのを予防する. また別の身近な例としては, いわゆる初乳効果があげられる. すなわち, 初乳中には高濃度の分泌型 IgA が含まれており, 新生児はこれを摂取することによりさまざまな感染症から免れることがわかっている. このように, 自分自身が抗体を生産して免疫力を獲得する能動免疫に対して, 外から特異的抗体を静注あるいは経口的に摂取することにより生体防御力を獲得することを受動免疫と呼んでいる. 受動免疫機構を利用すればさまざまな感染症を予防することが期待できるが, 受動免疫が成立するためには常に一定の特異的抗体を摂取し続けることが必要となる. そのために大量の抗体を安全に, かつ安価に確保するための原料および製造方法を検討しなくてはならない. 抗体原料としては, 抗原接種された母牛由来の初乳について研究されたことがあり, 受動免疫効果も報告されている<sup>(1)</sup>. しかし, 初乳中の特異的抗体濃度は出

産後急速に低下するため, 受動免疫に必要な大量の抗体を確保するという点から問題点が残っている. 一方, 鶏卵は抗体を大量製造するうえで最も適した原料であるといえる. ニワトリは 1 年間に 250~300 個もの卵を生み, 卵 1 個には 100 mg 以上の鶏卵抗体 (IgY) が含まれている<sup>(2)</sup>. またわれわれが日常的に食している卵を由来としているため安全性面においても比較的問題が少ないと考えられる. 本報では, 著者らが試みた IgY を利用した受動免疫の応用例として, 口腔内および消化管感染症の予防の研究について紹介したい.

### 1. むし歯の予防

むし歯は口腔内の常在菌によって引き起こされる感染症であり, その主要原因菌は *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) である. *S. mutans* はグルコシルトランスフェラーゼ (GTase) を持っており, 口腔内に砂糖が存在すると菌体表面に粘着性の非水溶性グルカンを生成する. 粘着性非水溶性グルカンをまとった *S. mutans* は歯面に強固に付着し, むし歯の原因となる歯垢 (プラーク) を形成する. プラークのなかでは *S. mutans*をはじめ, 他の口腔常在菌により糖から乳酸を主体とする酸が産生され, この酸により歯が溶かされ (脱灰), むし歯となっていく. この際, 非水溶性グルカンはこの酸を歯面に滞留させ, 脱灰を持続させる働きをしている. したがって, *S. mutans* の歯面への付着, あるいは非水溶性グルカンの働きを阻止できればむし歯を予防できるのではないかと考えられる. 著者らはこの点について IgY を用いて試験した.

ヒトの代表的むし歯菌は *S. mutans* のうち, 血清型 c であるから, まず *S. mutans* MT 8148 (c) 株を 5% ショ糖存在下で培養し, そのホルマリン死菌を抗原として産卵鶏を免疫した. 数度の免疫後, まずニワトリの血清中における同菌に対する特異的抗体価が上昇し, 1~2 週遅れて鶏卵の卵黄中にも特異的 IgY が現れた. それぞれの抗体価は 1/1000 以上, 1/10000 以上, 1/100000 以上と

† Application of IgY for Protection against Oral Disease and Gastrointestinal Infection.

Shigeo OTAKE, Masatomo HIRASAWA, and Ken TSUDA\* (Department of Clinical Pathology and Microbiology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba 271, \*Taiyo Kagaku Co., Ltd., Yokkaichi, Mie 510)

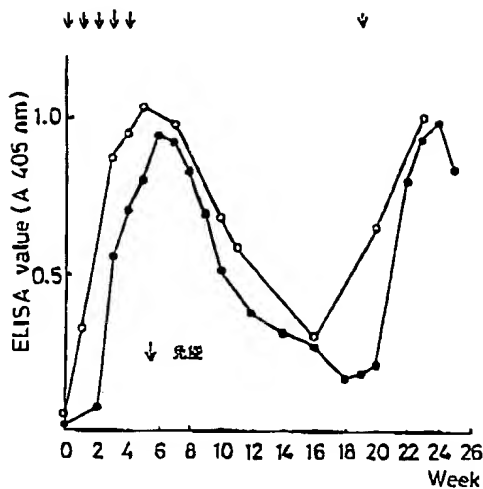


図1 *S. mutans* MT8148 に対する血清中および卵黄中の特異的抗体価の変動 (ELISA 価).  
○—○: 血清抗体価, ●—●: 卵黄抗体価.

加免疫を行うことにより再度上昇した (図1).

次に, 高い抗体価を持つ鶏卵卵黄を集め, 粉末化したものを抗 *S. mutans* IgY としてラットを用いた動物実験に供した. すなわち, *S. mutans* を口腔内に接種した JCL Sprague-Dawley rat を 20% IgY と 36% シュ糖を含む飼料で飼育し, 56 日目に屠殺してむし歯の発生を検査した. むし歯の程度は深さおよび面積から算定し, カリエススコアとして表した. その結果, 特異的 IgY を含まない対照区のカリエススコアが  $104.9 \pm 1.9$  であったのに対して, 特異的 IgY 2% 添加区  $81.4 \pm 6.5$ , 同 6.6% 添加区  $71.1 \pm 4.1$ , 同 20% 添加区  $42.8 \pm 2.8$  となり, それぞれ対照区と危険率 1% の有意差をもって特異的 IgY を含む飼料を与えたラットではむし歯の発生が抑えられたことがわかった (表1)<sup>(3)</sup>. 特異的 IgY が *S. mutans* の菌体表層に結合することによる歯面への付着阻害, および GTase により生成される非水溶性グルカンの働きを阻害した結果と考えられる.

## 2. ロタウイルス性下痢症の予防

厚生省の感染症サーベイランス調査によると, 乳幼児嘔吐下痢症の患者として毎年 10 万人以上が報告されて

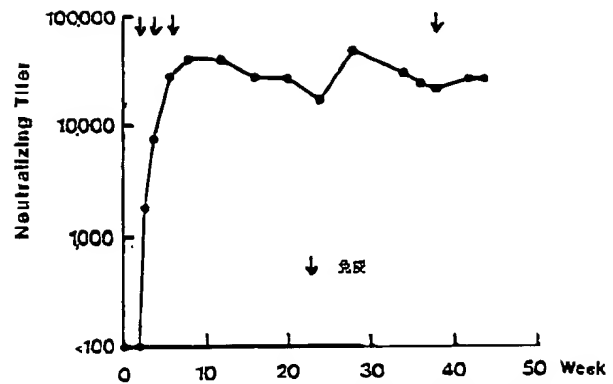


図2 ヒトロタウイルス (MO 株) に対する卵黄中の中和抗体価の変動

いる. 乳幼児嘔吐下痢症のうち, 約半数はロタウイルス (HRV) の感染によるものである. その主たる罹患年齢は2歳以下で, 激しい水様性の下痢と発熱, 嘔吐にみまわれる. 開発途上国では栄養不良と医療不備もあいまって, 年間数百万人もの乳幼児がロタウイルス性下痢症により死亡しているのが現状である. 通常ウイルス性感染症に対してはワクチンによる対処がなされるが, ロタウイルスが腸管上皮細胞という局所部位に感染することと感染対象が免疫学的に未熟な乳幼児であることから十分な分泌型 IgA を誘導することができず, 効果的なワクチンの開発までには至っていない<sup>(4)</sup>.

著者らは, 本ロタウイルス性下痢症に対して IgY を用いた経口受動免疫により予防することを目的として実験を行った. まずヒトロタウイルス MO 株 (血清型 3) を抗原として産卵鶏を免疫したところ, 抗原接種後速やかに卵黄中のロタウイルスに対する中和抗体価が上昇し, その後はほとんど追加免疫をすることもなく, 高い抗体価を維持できることがわかった (図2).

次に卵黄中から抗ロタウイルス IgY を精製し, 以下の動物実験に供した. ロタウイルス性下痢症のモデル実験系としては生後6日齢の乳飲みマウス (BALB/c) を使用した. 通常ウイルス感染は宿主特異性があるため動物実験では発症しないことが多いが, 血清型 3 のヒト =

表1 *S. mutans* 接種ラットにおける IgY によるむし歯予防効果

Groups (Ratio of immune/control yolk powder in diet)	Mean caries score ( $\pm$ SE)			
	Sulcal	Buccal	Approximal	Total
A (100/0)	$40.1 \pm 2.5$	$2.1 \pm 0.3$	$0.5 \pm 0.3$	$42.8 \pm 2.8$
B (33/67)	$64.1 \pm 3.7$	$5.6 \pm 0.4$	$1.4 \pm 0.6$	$71.1 \pm 4.1$
C (10/90)	$71.1 \pm 5.0$	$7.3 \pm 1.2$	$3.0 \pm 0.8$	$81.4 \pm 6.5$
D (0/100)	$90.4 \pm 1.1$	$9.6 \pm 1.1$	$4.9 \pm 0.8$	$104.9 \pm 1.9$

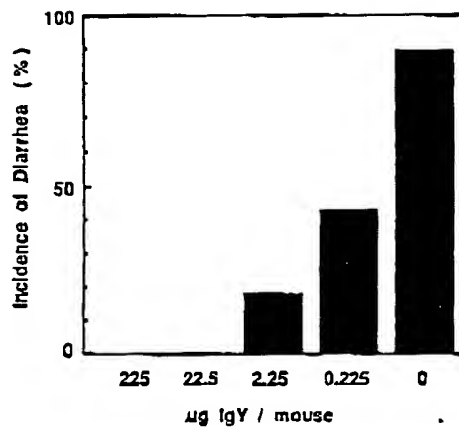


図3 乳飲みマウスにおける IgY による  
ヒトロタウイルス性下痢症予防効果

タウイルスは乳飲みマウスに対して感染し、下痢を誘発することができる。そこで乳飲みマウスに対し抗ロタウイルス IgY を経口的に投与しておき、その後のウイルス感染による下痢の発症を予防できるかどうかを試験した。その結果、IgY を与えない対照区では 88.9% のマウスに下痢が発症したのに対して、IgY を感染 1 時間前に 225 ng/マウス投与した区で 42.8%、2.25 μg/マウス投与した区で 18.2%、22.5 μg/マウス投与した区では完全に下痢を抑えることができた (図3)<sup>(6)</sup>。

以上、IgY を利用した口腔内および消化管感染症の受動免疫の例として、むし歯とロタウイルス性下痢症の予防について概説した。2つの実験はともにまだ動物での試験を終えたところであり、当然用法用量の結果がそのままヒトの場合に当てはまるわけではないが、少なくとも鶏卵から抽出した特異的抗体が経口受動免疫に有効であることが証明された。今後の研究課題としては、摂取

された IgY がどの程度の時間体内で活性を保っているのか、とくにロタウイルス性下痢症へ応用する場合、感染部位が小腸であるため活性を保持したまま胃内を通過させることが要求されるのでこの点についての検討が必要であろう。また IgY のアレルギー性についても調べ必要がある。一般的に卵アレルギーの患者は卵白成分に反応すると認められているが、卵黄成分である IgY についても十分試験しておく必要があると思われる。

IgY を口腔内および消化管疾患へ応用する場合、その期待する効果としてはどちらかといえば予防的意味合いが強い。したがって発症の可能性のある時期にあらかじめ摂取することが必要となり、治療効果を期待する場合と比較して、より大量の抗体の確保が要求されてくる。ここに特異的抗体の供給源としての鶏卵の真価が発揮できるものと著者らは考えている。

- (1) T. Ebina, A. Sato, K. Umezue, N. Ishida, S. Ohyama, A. Oizumi, K. Aikawa, S. Katagiri, N. Katsushima, A. Imai, S. Kitaoka, H. Suzuki, and T. Konno: *Med. Microbiol. Immunol.*, 174, 177—185 (1985).
- (2) H. Hatta, M. Kim, and T. Yamamoto: *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2531—2535 (1990).
- (3) S. Otake, Y. Nishihara, M. Makimura, H. Hatta, M. Kim, T. Yamamoto, and M. Hirasawa: *J. Dent. Res.*, 70, 162—166 (1991).
- (4) K. Midthum, H. B. Greenberg, Y. Hoshino, A. Z. Kapikian, R. G. Wyatt, and R. M. Chanock: *J. Virol.*, 53, 949—954 (1985).
- (5) T. Ebina, K. Tsukada, K. Umezue, M. Nose, K. Tsuda, H. Hatta, M. Kim, and T. Yamamoto: *Microbiol. Immunol.*, 34, 617—629 (1990).

# Confirmation Report-Memory Send

Time : Apr-19-01 03:54pm  
Tel line 1 : +7033084512  
Name : PTO

Job number : 986  
Date : Apr-19 03:50pm  
To : 915402319265  
Document Pages : 02  
Start time : Apr-19 03:53pm  
End time : Apr-19 03:53pm  
Pages sent : 02

Job number : 986

\*\*\* SEND SUCCESSFUL \*\*\*

<< IMPORTANT NOTICE >>  
-- PLEASE RETURN THIS FORM WITH EACH COMPLETED I.L. REQUEST OR SHIPMENT --  
-- PLEASE REFERENCE THIS REQUEST AS ITEM 341925 ON OUR INVOICE --

April 19, 2001

TO: VIRGINIA POLYTECHNIC INSTITUTE AND STATE UNIVERSITY

Blackburg, VA. No Zipcode!

Phone: 540-231-6170; 540-231-5589  
Fax: 540-231-9265

Email:  
Accent:

FROM: Linda Greene ( Linda.Greene@uspto.gov )  
Phone: 703-308-4510

Patent and Trademark Office  
Biotech-Chem Library, Reference Delivery  
2101 Crystal Plaza Arcade #275  
Arlington, Va. 22202

Please send the following VIA:

☐ Airtel  
☒ Federal Express (Account: 1504-4768-2)  
☐ Fax to 703-308-4516 ☐ Fax to 703-305-6956  
☐ Fax to 703-305-3585 ☐ Fax to 703-308-4512  
☐ Mail ☒ \*\*\*PLEASE RUSH\*\*\*

Item#341925 Title: GENETIC DATA ANALYSIS 11 Author: WEIR  
ISSN#  
OCLC#

Total Items =====>

1

Request complies with  
☐ 108(G)(2) Guidelines (CCG)

☐ other provisions of copyright law (CCI)